

УДК 615.453.42; 615.331

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ КАПСУЛИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПРОБИОТИКА «ИМБИКАПС»

Несчисляев В.А., Столбова М.Г., Мокин П.А.

Филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», Пермь, Россия (614089, г. Пермь, ул. Братская, 177)

Цель данной работы – разработка и исследование капсулированной лекарственной формы пробиотического препарата на основе иммобилизованных бифидобактерий. В работе использовали производственный штамм *Bifidobacterium bifidum* 1. Изучена возможность использования гомогената бурых водорослей (ламинарии и фукуса) в качестве сорбента для бифидобактерий. Апробированы варианты иммобилизации бифидобактерий, исследована их устойчивость к действию желудочного сока и желчи, выявлены высокие протективные свойства сорбента на основе бурых водорослей. Показано, что гомогенат бурых водорослей перспективен для производства пробиотических препаратов на основе иммобилизованных клеток. Разработана капсулированная лекарственная форма пробиотика на основе иммобилизованных бифидобактерий, подобран оптимальный состав препарата, типоразмер капсул и упаковка. Экспериментальные образцы пробиотика сохраняли необходимый уровень основных показателей в течение 21 месяца.

Ключевые слова: бифидобактерии, иммобилизация, бурые водоросли

DEVELOPMENT AND STUDY OF PROBIOTIC CAPSULE DOSAGE FORM «IMBICAPS»

Neschislyayev V.A., Stolbova M.G., Mokin P.A.

Perm branch “BIOMED” of MICROGEN State Unitary Company, Perm, Russia (614089, Perm, street Bratskaya, 177)

The purpose of this research was to develop of probiotic capsule dosage form with immobilized bifidobacteria. The strain of probiotic microorganism was *Bifidobacterium bifidum* 1. The possibility of brown algae homogenate application as a sorbent for probiotic microorganisms was studied. Variants of bifidobacteria immobilization were tested, and their resistance to gastric juice and bile was investigated. The work revealed high protective properties of the sorbent on the basis of brown algae and their homogenate was demonstrated as a promising sorbent for the production of probiotic preparations on the basis of the immobilized cells. Capsulate dosage form for probiotic with immobilized bifidobacteria was developed, along with the determination of the drug optimal composition, capsule size and type of packaging. The experimental samples of the probiotic retained the required level of the main quality attributes during 21 months.

Keywords: bifidobacteria, immobilization, brown algae

Введение

На протяжении последних десятилетий проблемам нарушения микробиоценоза и методам его коррекции уделяется пристальное внимание. По данным Российской академии наук, до 90% населения страны страдают теми или иными отклонениями от оптимального состава кишечной микрофлоры [3]. Общепринятая терапевтическая тактика восстановления нормальной микрофлоры макроорганизма основана на комплексном использовании различных препаратов, среди которых ведущая роль отводится пробиотикам, особенно на основе бифидобактерий.

Пробиотики представляют собой живые клетки и (или) метаболиты специально подобранных штаммов микроорганизмов, способных в условиях желудочно-кишечного тракта восстанавливать индигенную микрофлору. Бифидобактерии, как важнейшие представители симбиотического микробиоценоза организма человека, широко используются

в составе пробиотических препаратов для коррекции дисбиозов кишечного биотопа, но отличаются низкой устойчивостью к действию желудочного сока и желчи, что приводит к значительной потере жизнеспособности культуры на момент попадания в кишечник и, следовательно, к снижению эффективности препаратов на их основе.

Таким образом, большое значение при разработке эффективных пробиотических препаратов имеет защита бифидобактерий от бактерицидного действия желудочного сока и желчи. Одним из перспективных направлений развития пробиотиков является разработка препаратов на основе иммобилизованных на различных сорбентах клетках. Иммобилизация является одним из способов повышения устойчивости клеток, входящих в состав пробиотических лекарственных средств и БАД. При этом важную роль играют природа и технологические свойства потенциального сорбента [1, 2, 4, 5].

Кроме того, ограниченность спектра выпускаемых в НПО «Микроген» лекарственных форм пробиотических препаратов снижает потребительский потенциал и конкурентоспособность последних на фармацевтическом рынке. Переход к выпуску капсулированных лекарственных форм взамен лиофилизатов во флаконах возможен при решении проблем, связанных с технологическими свойствами лиофилизированной бактериальной массы (низкая сыпучесть, высокая гигроскопичность). Следовательно, поиск и внедрение эффективных технологических приемов, направленных на улучшение свойств сухой биомассы бифидобактерий, отвечает потребностям развития производства пробиотических препаратов.

Дополнение терапевтического эффекта и разработка капсулированной формы препарата на основе иммобилизованных бифидобактерий является актуальным направлением исследований в сфере усовершенствования бифидосодержащих пробиотиков и повышения их конкурентоспособности.

Цель: разработка и исследование капсулированной лекарственной формы пробиотического препарата «Имбакапс» на основе иммобилизованных бифидобактерий.

Материал и методы

В работе использовали производственный штамм *Bifidobacterium bifidum* 1. Для культивирования бифидобактерий и контроля их биологических показателей применяли казеиново-дрожжевую питательную среду и модифицированную печеночную среду Блаурокка производства НПО «Биомед».

В качестве сорбента использовали гомогенат бурых водорослей (фукус и ламинария). Гомогенат бурых водорослей перемешивали с бактериальной взвесью в течение 30 мин, добавляли защитную сахарозо-желатино-молочную среду и полученную суспензию разливали в металлические кассеты с последующим лиофильным высушиванием. Сухую

биомассу извлекали из кассет и на ее основе готовили порошковые смеси со вспомогательными веществами (лактоза, каолин) для наполнения твердых желатиновых капсул (ТЖК).

Образцы порошков фасовали в капсулы по 0,25 г при помощи ручной машины МС-1,2 (Италия), экспериментально-производственные серии капсулированного препарата получали на автоматической капсулонаполняющей машине Zanasi 40F (ИМА). Капсулы упаковывали в полимерные банки с винтовой горловиной из полиэтилена высокой плотности, с крышками с силикагелевой вставкой и контролем первого вскрытия.

Порошок и капсулы контролировали по следующим параметрам: сыпучесть, насыпная плотность, гигроскопичность, остаточная влажность, распадаемость, средняя масса капсул, потеря в массе при высушивании, рН, количество живых бифидобактерий (КОЕ) в 1 г порошка, активность кислотообразования.

При моделировании условий пищеварения применяли искусственный желудочный сок следующего состава: пепсина – 3 г, кислоты хлороводородной концентрированной – 6 мл, воды очищенной до – 1 л, а также желчь медицинскую консервированную. Регидратированные образцы сухой биомассы инкубировали при 38 °С в присутствии желудочного сока в течение 30 мин, в присутствии желчи – в течение 2 ч, контрольные образцы – в 0,9% растворе натрия хлорида. Для определения показателя КОЕ до и после окончания инкубации отбирали по 1 мл бактериальной взвеси и высевали в среду Блаурокка (десятикратные разведения) с последующим подсчетом выросших колоний.

Антагонистическую активность определяли методом перпендикулярных штрихов в тесте отсроченного антагонизма с использованием стандартного набора тест-штаммов.

Результаты и обсуждение

При разработке лекарственных форм пробиотических препаратов важное значение имеет определение чувствительности живых микроорганизмов производственного штамма к неблагоприятным условиям желудочно-кишечного тракта человека. С этой целью была изучена устойчивость бифидобактерий к действию искусственного желудочного сока и желчи.

Установлено, что количество жизнеспособных клеток в контрольных образцах без добавления желудочного сока составляло не менее 10^8 КОЕ/г. После инкубации в желудочном соке отмечено снижение показателя КОЕ/г на 3 порядка в образцах иммобилизованных бифидобактерий. Значительное изменение активности наблюдалось в образце с неиммобилизованными клетками – показатель КОЕ/г снизился на 5 порядков. Контакт с желчью в течение 2 ч снизил показатель КОЕ на 4–5 порядков в образцах иммобилизованных и свободных клеток (табл. 1).

Устойчивость бифидобактерий к действию желудочного сока и желчи

Образец	Сорбент	Содержание бифидобактерий, КОЕ/г		
		Исходное	Желуд. сок, экспозиция 30 мин при 38 °С	Желчь, экспозиция 2 ч при 38 °С
Биомасса 1	Ламинария	$2,43(\pm 0,23) \times 10^8$	$1,07(\pm 0,58) \times 10^5$	$5,03(\pm 0,09) \times 10^4$
Биомасса 2	Фукус порошок	$2,53(\pm 0,28) \times 10^8$	$1,65(\pm 0,25) \times 10^5$	$1,27(\pm 0,12) \times 10^4$
Контроль	-	$1,98(\pm 0,19) \times 10^8$	$2,85(\pm 0,65) \times 10^3$	$4,0(\pm 0,58) \times 10^3$

Таким образом, результаты экспериментов подтверждают, что бифидобактерии, иммобилизованные с помощью гомогената бурых водорослей, обладают более высокой резистентностью к воздействию желудочного сока, что позволяет сохранить в значительной степени выживаемости клеток при прохождении через желудочно-кишечный тракт и создавать более эффективные препараты на их основе.

В результате сравнительного контроля антагонистической активности иммобилизованных бифидобактерий и бифидумбактерина сухого (неиммобилизованные клетки) установлено, что иммобилизованные клетки по уровню антагонизма не уступают контролю, а в ряде случаев имеют преимущества.

Для получения порошковых смесей с необходимыми технологическими параметрами требуется применение вспомогательных веществ, введение которых позволяет снизить гигроскопичность исходной биомассы, улучшить сыпучесть и оптимизировать насыпную плотность порошка для капсулирования.

В качестве вспомогательных веществ в работе апробировали лактозу и каолин в количестве 10, 20, 30 % от массы лиофилизата. Данные вспомогательные вещества, не изменяя существенно показатель гигроскопичности, значительно влияли на стабильность физического состояния биомассы. Образцы с лактозой имели наименьшее значение гигроскопичности при относительной влажности 77 и 100 %, однако при их экспозиции происходила потеря исходных свойств (сыпучесть, цвет) уже в течение часа, тогда как составы, в которых в качестве вспомогательного вещества применялся каолин, сохраняли свои свойства даже через 24 ч. Поэтому каолин был использован для наработки экспериментальных образцов порошков для наполнения капсул.

На основании технических показателей (сыпучесть, гигроскопичность, насыпная плотность) образцов порошков с различным содержанием каолина установлено, что варианты с 20 % содержанием каолина от массы лиофилизата обладали наиболее приемлемыми параметрами, обеспечивающими полноту заполнения капсулы и точность дозирования.

С учетом необходимых показателей специфической активности и технологических параметров экспериментальных порошков для наполнения были выбраны капсулы № 2 со средней вместимостью 0,37 см³, обеспечивающие возможность наполнения капсул порошком с необходимой дозировкой бифидобактерий (КОЕ/г не менее 10⁸ на начало срока годности). С учетом вышеуказанного наработаны 5 экспериментальных серий препарата на основе иммобилизованных бифидобактерий и каолина.

Введение вспомогательных веществ не гарантирует сохранность содержимого наполненных капсул в течение всего предполагаемого срока годности. Поэтому очень важным является выбор вида упаковки, обеспечивающей защиту препарата от воздействия влажности и кислорода воздуха, и её соответствие современным требованиям, учитывающим потребительские предпочтения и технико-экономические аспекты производства пробиотиков.

Полученные экспериментальные образцы капсул были помещены в герметично закрывающиеся полимерные банки из полиэтилена высокого давления с силикагелевой вставкой и заложены на хранение при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с СП 3.3.2.1248-03. В течение 21 месяца экспериментальные образцы контролировали по основным физико-химическим и биологическим показателям. Результаты периодического контроля показали, что при хранении в течение указанного срока качество твердых желатиновых капсул соответствовало предъявляемым к данной форме требованиям в соответствии с ОФС «Капсулы», ГФ XII, вып. 2. В процессе наблюдения внешний вид капсул и их содержимое визуально не изменялись. При контроле параметров специфической активности было установлено, что ее необходимый уровень сохранялся в течение срока наблюдения и был не ниже регламентированного – не менее 1×10⁸ КОЕ/г в соответствии с СанПиН 2.3.2.1078-01, активность кислотообразования препарата всех экспериментальных капсул составляла не менее 90 °Т.

Выводы

Таким образом, результаты проведенной работы позволяют сделать следующие выводы:

1. Сорбенты на основе бурых водорослей защищают клетки бифидобактерий от действия желудочного сока.
2. Подобран оптимальный состав препарата на основе иммобилизованных бифидобактерий и определен необходимый типоразмер капсул.
3. Показана целесообразность использования для первичной упаковки капсул полимерных банок с винтовой крышкой, имеющей силикагелевую вставку. Минимальный срок годности (хранения) для капсульной формы препарата на основе иммобилизованных клеток – 18 мес.

4. Обоснована необходимость расширения линейки выпускаемых лекарственных форм пробиотиков на основе бифидобактерий за счет внедрения в производство капсульной формы препарата на основе иммобилизованных клеток.

Список литературы

1. Амерханова А.М. Бифидобактерии как основа для создания иммунобиологических препаратов // Новые лекарственные препараты. – 2004. - № 3. – С. 39-43.
2. Андреева И.В. Доказательства обоснованности профилактического применения пробиотиков // Фарматека. – 2006. - № 6. – С. 62-68.
3. Бондаренко В.М., Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией // Журн. микробиол. – 2004. - № 1. – С. 84-92.
4. Бондаренко В.М. О совершенствовании пробиотических препаратов // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2008. - № 2–3. – С. 24.
5. Корочинский А.В., Верниковский В.В., Степанова Э.Ф. Исследование возможности создания иммобилизованных структур на базе пробиотиков // Успехи современного естествознания. – 2010. - № 5. – С. 34-38.

Рецензенты:

Раев М.Б., д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь.

Маслов Ю.Н., д.м.н., профессор, профессор кафедры микробиологии и вирусологии, ГБОУВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера», г. Пермь.